

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000951

International filing date: 26 January 2005 (26.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-028041  
Filing date: 04 February 2004 (04.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

31.1.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2004年 2月 4日

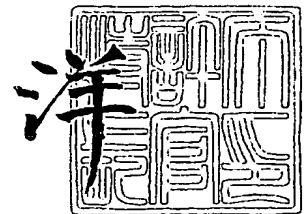
出 願 番 号  
Application Number: 特願2004-028041  
[ST. 10/C]: [JP2004-028041]

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社カネカ

2005年 3月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 B040008  
【提出日】 平成16年 2月 4日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 9/78  
C12N 15/55  
C12N 15/63  
C12N 1/20

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社 高砂工業所内  
【氏名】 柳澤 恵広

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社 高砂工業所内  
【氏名】 上田 真

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社 高砂工業所内  
【氏名】 難波 弘憲

【特許出願人】  
【識別番号】 000000941  
【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社  
【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 005027  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

以下の (a) 又は (b) のポリペプチド:

(a) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド:

(b) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失および／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアミダーゼ活性を有するポリペプチド。

**【請求項 2】**

アースロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物に由来する請求項 1 に記載のポリペプチド。

**【請求項 3】**

微生物がアースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) KNK1101J (FERM P-19564) である請求項 2 に記載のポリペプチド。

**【請求項 4】**

請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリペプチドをコードする DNA。

**【請求項 5】**

以下の (c) 又は (d) の DNA:

(c) 配列表配列番号 3 に示される塩基配列からなる DNA:

(d) 配列表配列番号 3 に示される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が置換、挿入、欠失および／または付加された塩基配列を有し、かつアミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA。

**【請求項 6】**

請求項 4 又は 5 に記載のいずれかの DNA がベクターに挿入された組換えプラスミド。

**【請求項 7】**

ベクターが pUC18、pUC19、pBR322、pACYC184、pSC101、pT7Blue、又は pUCNT である請求項 6 に記載の組換えプラスミド。

**【請求項 8】**

組換えプラスミドが図 2 の制限酵素地図にて特定される pHA002 である請求項 6 又は 7 に記載の組換えプラスミド。

**【請求項 9】**

請求項 6 から 8 のいずれかに記載の組換えプラスミドで宿主微生物を形質転換して得られる形質転換体。

**【請求項 10】**

宿主微生物がエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) である請求項 9 に記載の形質転換体。

**【請求項 11】**

形質転換体がエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) HB101 (pHA002) (FERM P-19646) である請求項 9 に記載の形質転換体。

**【請求項 12】**

請求項 1 に記載のポリペプチドを生産する能力を有し、かつ、アースロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物。

**【請求項 13】**

アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) KNK1101J (FERM P-19564)、又は、その変異株である請求項 12 に記載の微生物。

**【請求項 14】**

請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリペプチドを生産する能力を有する微生物を培養し、培養物中に当該ポリペプチドを蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするアミダーゼの製造方法。

**【請求項 15】**

微生物が請求項 9 から 11 のいずれかに記載の形質転換体、又は、請求項 12 若しくは

13 記載の微生物である、請求項 14 記載の製造方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】アミダーゼ活性を有するポリペプチド及びその遺伝子

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アミダーゼ活性を有するポリペプチド、その遺伝子、及び当該ポリペプチドを生産する能力を有する微生物あるいは形質転換体を用いたアミダーゼの製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アミダーゼ（酵素番号 [EC 3. 5. 1. 4]）はカルボン酸アミドをカルボン酸とアンモニアに加水分解する酵素であり、例えばラセミ体  $\alpha$ -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解して光学活性  $\alpha$ -アミノ酸を生成するなど産業上有用な活性を持つことが知られている。なお、光学活性  $\alpha$ -アミノ酸は医薬品の合成中間体や甘味料として有用な化合物である。また、アミダーゼがエステルを基質とした加水分解反応を触媒することも報告されている（非特許文献1）。

## 【0003】

光学活性  $\alpha$ -アミノ酸の製造方法は数多く知られているが、特にD- $\alpha$ -アミノ酸は発酵法による大量生産が困難であることから、安価で効率の良い合成法の開発が望まれている。例えば、生物学的手法によるD- $\alpha$ -アミノ酸の合成方法として、アミダーゼ活性を有する微生物もしくは酵素を用いてラセミ体  $\alpha$ -アミノ酸アミドから光学分割により製造する以下のような方法が知られている。

(1) ロドコッカス (Rhodococcus) 属に属する微生物が有するD- $\alpha$ -アミノ酸アミドを特異的に加水分解する活性を用いて、ラセミ体  $\alpha$ -アミノ酸アミドからD- $\alpha$ -アミノ酸を製造する方法（特許文献1）。

(2) アクロモバクター (Achromobacter) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属、バチルス (Bacillus) 属、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、プロタミノバクター (Protaminobacter) 属、マイコバクテリウム (Mycobacterium) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、又はストレプトマイセス (Streptomyces) 属に属する微生物が生産するアミノペプチダーゼを用いて、ラセミ体  $\alpha$ -アミノ酸アミドからD- $\alpha$ -アミノ酸を製造する方法（特許文献2）。

(3) アースロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物が生産するアミダーゼを用いて、ラセミ体アラニンアミドからD-アラニンを製造する方法（特許文献3及び4）。

(4) アクロモバクター (Achromobacter) 属に属する微生物が有するD- $\alpha$ -アミノ酸アミドを特異的に加水分解する活性を用いて、ラセミ体  $\alpha$ -アミノ酸アミドからD- $\alpha$ -アミノ酸を製造する方法（特許文献5）。

(5) 遺伝子工学的手法を用いて改変を加えた、微生物由来のD-アミノ酸アミダーゼ遺伝子を有する形質転換体を用いて、ラセミ体  $\alpha$ -アミノ酸アミドからD- $\alpha$ -アミノ酸を製造する方法（特許文献6）。

## 【0004】

しかしながら、上記(1)から(4)の方法は用いられている微生物が有する加水分解活性が低いため、工業的利用に際して十分とは言えない。

## 【0005】

また、(5)の方法ではオクロバクトラム (Ochrobactrum) 属の細菌由来のD-アミノ酸アミダーゼについてのみ記載されており、アースロバクター (Arthrobacter) 属細菌については全く言及されていない。

## 【0006】

一方、アースロバクター (Arthrobacter) 属の細菌がアミダーゼを生産することは一般に知られており、酵素を精製、単離し、その性質を明らかにした例もあるが（特許文献3及び4、非特許文献2及び3）、該酵素のアミノ酸配列、及び該酵素をコードする遺伝子

のDNA配列についての報告はなされていない。

【特許文献1】特開昭63-87998

【特許文献2】特公平7-106149

【特許文献3】米国特許第5130240号

【特許文献4】米国特許第5252470号

【特許文献5】特開平2-234678

【特許文献6】特開2002-253256

【非特許文献1】Eur. J. Biochem.、2000年、267巻、2028頁

【非特許文献2】Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、1992年、56巻、12号、1980頁

【非特許文献3】Agricultural and Biological Chemistry、1982年、46巻、5号、1175頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記に鑑み、本発明の目的はラセミ体アミノ酸アミド及びラセミ体アミノ酸エステルの光学分割に利用可能な新規D-アミダーゼを提供することにある。また、本発明の目的は、当該D-アミダーゼのアミノ酸配列とその遺伝子のDNA配列を明らかにし、当該酵素を生産する能力を有する微生物あるいは形質転換体及びそれらを用いた当該酵素の製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は上記に鑑み鋭意検討を行った結果、D-アミノ酸アミド及びD-アミノ酸エステルを立体選択的に加水分解する新規D-アミダーゼを生産するアースロバクター（Arthrobacter）属細菌を新たに土壌より分離した。そして、本細菌から当該アミダーゼを単離、精製し、アミダーゼ遺伝子の単離、及び宿主微生物での発現を達成し、発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち本発明は、以下の（a）又は（b）のポリペプチドである：

（a）配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

（b）配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつアミダーゼ活性を有するポリペプチド。

【0010】

本発明はまた、上記のポリペプチドをコードするDNAである。

【0011】

本発明はまた、以下の（c）又は（d）のDNAである：

（c）配列表配列番号3に示す塩基配列からなるDNA、

（d）配列表配列番号3に示される塩基配列において1若しくは数個の塩基が置換、挿入、欠失および／または付加された塩基配列を有し、アミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【0012】

また、本発明は、上記のDNAがベクターに挿入された組換えプラスミドである。

【0013】

また、本発明は上記のDNAまたは組換えプラスミドで宿主微生物を形質転換して得られる形質転換体である。

【0014】

また、本発明は、上記ポリペプチドを生産する能力を有し、アースロバクター（Arthrobacter）属に属する微生物である。

## 【0015】

また、本発明は、上記のポリペプチドを生産する能力を有する微生物、又は上記形質転換体を培養し、培養物中に当該ポリペプチドを蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするアミダーゼの製造方法である。

## 【発明の効果】

## 【0016】

本発明は上述の構成からなり、新規なアミダーゼを効率よく製造することができる。また、当該アミダーゼ、又は、当該アミダーゼを生産する微生物を利用して、アミノ酸アミド又はアミノ酸エステルから効率よくD-アミノ酸を製造することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0017】

以下、本発明を詳細に説明する。

まず、本発明のポリペプチドについて説明する。本発明のポリペプチドはアミダーゼ活性を有するポリペプチドであって、D-アミノ酸アミド及びD-アミノ酸エステルを立体選択的に加水分解することが可能である。

## 【0018】

本発明において、ポリペプチドのアミダーゼ活性は、D-フェニルアラニンアミド50 mMを含むトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) -塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中、30℃で反応を行い、生成するフェニルアラニンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等を用いて定量することにより検出・測定し得る。

## 【0019】

本発明のポリペプチドは、アミダーゼ活性を有する微生物から取得できる。同ポリペプチドを生産する微生物であれば特に限定されないが、例えばアースロバクター (Arthrobacter) に属する微生物が挙げられ、なかでもアースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) が好ましく、より好ましくは、本発明者らが土壌より新たに分離したアースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) KNK1101J株である。

## 【0020】

上記のアースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) KNK1101J株は、平成15年10月22日に受託番号FERM P-19564として独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。以下に、アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) KNK1101J株の菌学的性質を示す。

## 1. 形態

- 1) 直径0.7~0.8  $\mu$ m、長さ1.0~1.5  $\mu$ m程度の桿菌
- 2) グラム染色：陽性
- 3) 運動性：なし
- 4) 孢子形成：なし
- 5) 細胞の多形性：なし
- 6) 肉汁寒天平板培地上でのコロニー形態：円形、全縁滑らか、低凸状、光沢あり、淡黄色

## 2. 培養的性質

- 1) ニュートリエントアガー (オキシイド製) 培地  
色：なし、光沢：なし、色素生産：なし
- 2) ニュートリエントプロス (オキシイド製) 培地  
表面発育：なし、培地の混濁：あり
- 3) ゼラチン穿刺培養  
生育：なし、ゼラチン変化：なし
- 4) リトマスミルク  
凝固：なし、液化：なし。



## 3. 生理学的試験

- 1) 硝酸塩の還元: -
- 2) 脱窒反応: -
- 3) MRテスト: -
- 4) VPテスト: -
- 5) インドール産生: -
- 6) 硫化水素の産生: -
- 7) デンプンの加水分解: +
- 8) クエン酸の利用 Koser: +、Christensen: +
- 9) 無機窒素の利用 硝酸塩: +、アンモニウム塩: +
- 10) ウレアーゼ活性: -
- 11) オキシダーゼ活性: -
- 12)カタラーゼ活性: +
- 13)  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性: +
- 14) アルギニンジヒドロラーゼ活性: -
- 15) リジンデカルボキシラーゼ活性: -
- 16) トリプトファンデアミナーゼ活性: -
- 17)ゼラチナーゼ活性: -
- 18) ピラジナミダーゼ活性: +
- 19) ピロリドニルアリルアミダーゼ活性: +
- 20) アルカリフォスファターゼ活性: +
- 21)  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性: -
- 22) N-アセチル- $\beta$ -グルコザミニダーゼ活性: -
- 23)  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性: +
- 24) エスクリン ( $\beta$ -グルコシダーゼ) 活性: +
- 25)ゼラチン加水分解活性: -
- 26) 生育の範囲
  - pH 5: +、pH 9: +、pH 10: +
  - 20℃: +、25℃: +、40℃: +W、45℃: -
- 27) 生育条件 好気性: +、嫌気性: -
- 28) O-Fテスト (酸化/発酵): -/-
- 29) 糖類からの酸及びガス産生 (酸/ガス)
  - L-アラビノース: -/-
  - D-グルコース: +/-
  - D-フラクトース: +/-
  - マルトース: -/-
  - ラクトース: -/-
  - D-ソルビトール: -/-
  - イノシトール: -/-
  - D-キシロース: +/-
  - D-マンノース: +/-
  - D-ガラクトース: +/-
  - サクロース: +/-
  - トレハロース: +W/-
  - D-マンニトール: +/-
  - グリセリン: +/-
- 30) 発酵性試験
  - ブドウ糖: -
  - リボース: -

キシロース：－  
 マンニトール：－  
 マルトース：－  
 乳糖：－  
 白糖：－  
 グリコーゲン：－

30) 主要メナキノン成分：MK-9 (H<sub>2</sub>)

31) 菌体脂肪酸組成：

【0021】

【表1】

脂肪酸		組成比 (%)
C15:0	ANTE ISO	60.58
C15:0	ISO	11.44
C16:0	ISO	10.63
C17:0	ANTE ISO	7.06
C16:0		4.14
C14:0	ISO	3.13
C14:0		1.88
C17:0		1.14

【0022】

なお、本発明のポリペプチドを生産する微生物は、上述した微生物の野生株であっても良いし、変異改良された変異株であってもよい。変異株は、UV照射や、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG)、エチルメタンスルフォネート (EMS) 等の薬剤による処理といった当業者に周知の方法で取得することができる。

【0023】

本発明のポリペプチドを生産する微生物を培養する培地としては、その微生物が増殖し得るものである限り特に限定されない。例えば、炭素源として、グルコース、シュクロース等の糖質、エタノール、グリセロール等のアルコール類、オレイン酸、ステアリン酸等の脂肪酸及びそのエステル類、菜種油、大豆油等の油類、窒素源として、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、ペプトン、カザミノ酸、コーンステイプリカー、ふすま、酵母エキスなど、無機塩類として、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウムなど、他の栄養源として、麦芽エキス、肉エキス等を含有する通常の液体培地が使用され得る。更に、アミダーゼの生産を増強させるような物質、例えば、アミノ酸アミド、脂肪酸アミド等のアミド類、あるいはアミノ酸エステル、脂肪酸エステル等のエステル類を少量添加することもできる。これらアミダーゼ生産増強物質の培地中濃度は、0.001重量%以上、10重量%以下、好ましくは0.01重量%以上、1重量%以下の範囲から選ばれる。

【0024】

培養は通常好気的に行い、温度として10℃以上、60℃以下、好ましくは20℃以上、50℃以下の範囲、pHとしては3以上、11以下、好ましくはpH5以上、9以下の範囲が用いられ、培養時間は1日以上、5日間以下程度で行い得る。また、回分式、連続式のいずれの培養方法でもよい。

【0025】

培養終了後に培養液から遠心分離などにより菌体を集め、超音波破碎などの手段により菌体を破碎して粗酵素液を得る。この粗酵素液を、塩析法、カラムクロマトグラフィー法などにより精製することで、本発明のポリペプチドを得ることができる。

## 【0026】

本発明のポリペプチドは、上記のように微生物から取得される天然酵素であってもよいし、遺伝子組換え技術を利用して生産される組換え酵素であってもよい。天然酵素としては、配列表の配列番号1に示されるポリペプチドをあげることができる。

## 【0027】

また、本発明のポリペプチドは、配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アミダーゼ活性を有するポリペプチドであってもよい。

## 【0028】

「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、追加、挿入及び／又は置換されたアミノ酸配列」は、部分特異的突然変異誘発法など当業者に周知の方法により、アミノ酸を欠失、追加、挿入及び／又は置換することにより取得可能である。具体的には、Nucleic Acid Res. 10, 6487(1982)、Methods in Enzymology 100, 448(1983)等の文献に記載されている。

## 【0029】

また、「アミダーゼ活性を有するポリペプチド」とは、上記の活性測定条件において、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いた場合の10%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上の活性を示すポリペプチドのことをいう。

## 【0030】

次に、本発明のDNAについて説明する。本発明のDNAは上記のようなポリペプチドをコードするDNAであればよい。配列表の配列番号3で示されるDNAであってもよいし、配列番号3で示される塩基配列において1若しくは数個の塩基が置換、挿入、欠失および／または付加された塩基配列を有するDNAであっても良い。

## 【0031】

ここで、「1若しくは数個の塩基が欠失、追加、挿入及び／又は置換された塩基配列」とは、蛋白核酸酵素増刊 遺伝子増幅PCR法 35(17), 2951-3178(1990)又はHenry A. Erlich編 加藤郁之進鑑訳 PCRテクノロジー(1990)等に記載の当業者に周知の方法により欠失、追加、挿入及び／又は置換できる程度の数の塩基が欠失、追加、挿入及び／又は置換されてなる塩基配列を意味する。

## 【0032】

本発明のDNA(アミダーゼ遺伝子)は、前述したようなアミダーゼ活性を有する微生物から取得することができる。目的のDNAを取得するには、例えば以下の方法によることができる。

## 【0033】

まず、アミダーゼ活性を有する微生物より精製されたアミダーゼのN末端のアミノ酸配列を、気相プロテイン・シーケンサーなどで決定する。また、精製されたアミダーゼにリジルエンドペプチダーゼ等のプロテアーゼを作用させて適当な大きさのポリペプチドに消化した後、HPLC等を用いて得られたポリペプチドを精製し、上記と同様の方法に従って内部アミノ酸配列を決定する。このようにして得られたN末端アミノ酸配列及び内部アミノ酸配列にもとづいて設計したDNAプライマーを合成する。

## 【0034】

次に、アミダーゼの起源となる微生物より、染色体DNAを単離する。染色体のDNAは、培養された細胞を界面活性剤、臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)、クロロホルム、フェノール等で溶解、処理後、抽出されたDNAをイソプロパノールで析出し、遠心分離で得られた沈殿のDNAをエタノールで洗浄することで得られる(例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)を参照)。

## 【0035】

この染色体DNAを鋳型に、上記のDNAプライマーを用いてPCRを行うことで、目的の遺伝子の一部を取得できる。

## 【0036】

次に、既に取得した部分遺伝子のさらにN末側とC末側をコードするDNA断片をインバースPCR法により取得することができる（例えばNucleic Acids Res. 16, 8186(1988)を参照）。このDNA断片の塩基配列を決定後、酵素のN末端をコードするDNAよりも上流、C末端をコードするDNAより下流と推定されるDNAの塩基配列にもとづきDNAプライマーを作成して、この配列の間のDNAを先に得た染色体DNAを鋳型としたPCRにより増幅することで目的アミダーゼ遺伝子の全長を含むDNA断片を取得できる。

## 【0037】

次いで、得られたアミダーゼ遺伝子を含むDNA断片をベクターDNAとT4 DNAリガーゼなどを用いて結合させることにより組換えプラスミドを得ることができる。このプラスミドを用いて、ベクターに挿入したアミダーゼ遺伝子を含むDNA断片部分の塩基配列を解析、アミダーゼ酵素のN末端アミノ酸配列及び内部アミノ酸配列をコードする塩基があることを確認し、また、これより翻訳開始部位と終止コドンを確認することでオープンリーディングフレームを決定する。

## 【0038】

このようにして取得したDNA、または該DNAをベクターに組み込んで得られる組換えプラスミドを用いることにより、宿主微生物を形質転換し形質転換体を得ることができる。

## 【0039】

宿主、ベクターとしては、「組換えDNA実験指針」（科学技術庁研究開発局ライフサイエンス課編：平成8年3月22日改定）に記載の宿主—ベクター系を用いることができる。例えば、宿主としては、エシェリヒア（*Escherichia*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、フラボバクテリウム（*Flavobacterium*）属、バチルス（*Bacillus*）属、セラチア（*Serratia*）属、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属、プレビバクテリウム（*Brevibacterium*）属、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）属、アセトバクター（*Acetobacter*）属、グルコノバクター（*Gluconobacter*）属、ラクトバチルス（*Lactobacillus*）属、ストレプトコッカス（*Streptococcus*）属またはストレプトマイセス（*Streptomyces*）属に属する微生物を用いることができる。ベクターは上記の宿主内で自律複製できる微生物由来のプラスミド、ファージまたはその誘導体が使用できる。なかでも、宿主微生物としてエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）、ベクターとして当該微生物中で自律複製できるベクターを用いるのが好ましい。このようなベクターとしては、例えば、pUC18、pUC19、pBR322、pACYC184、pSC101、pT7Blue、又はpUCNTを挙げることができる。また、酵素の生産量を上昇させるために強力な構造プロモーターをもつように改質したベクターを使用することもできる。

## 【0040】

形質転換体の一例として、上記のようにして取得したDNAをpUCNT（WO94/03613参照）に組み込んだ組換えプラスミドpHA002を用いてエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）HB101を形質転換し、形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）HB101（pHA002）を得ることができる。

## 【0041】

本発明で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）HB101（pHA002）は平成16年1月22日に受託番号FERM P-19646として独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。

## 【0042】

なお、本発明で用いた組換えDNA技術は当該分野において周知であり、例えば、Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)に記載されている。

## 【0043】

本発明のアミダーゼを生産しうる微生物（アースロバクター・エスピー（*Arthrobacter*

sp.) KNK1101J若しくはその変異株、上記形質転換体等)を培養することにより当該酵素を大量に生産することができ、D-アミノ酸の製造に利用することができる。

#### 【0044】

微生物の培養は、通常の培地を用いて行えば良い。培養に使用する培地としては、炭素源、窒素源および無機塩類などの栄養素を含む通常の培地で良い。これに、ビタミン、アミノ酸などの有機微量栄養素を添加すると、好ましい結果が得られる場合が多い。炭素源としては、グルコースやシュクロースのような炭水化物、酢酸のような有機酸、アルコール類などが適宜使用される。窒素源としては、アンモニウム塩、アンモニア水、アンモニアガス、尿素、酵母エキス、ペプトン、コーンス・ティープ・リカーなどが用いられる。無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、鉄塩、硫酸塩、塩素などが用いられる。

#### 【0045】

培養は温度範囲25℃から40℃で行えるが、25℃から37℃が特に好ましい。また、pHは4から8で培養できるが5から7:5が好ましい。また、回分式、連続式のいずれの培養方法でもよい。

#### 【0046】

必要に応じてイソプロピルー1-チオーβ-D-ガラクトサイド(IPTG)、ラクトース等の添加等の酵素誘導のための処理を行うこともできる。

#### 【0047】

本発明のアミダーゼをアミノ酸アミドまたはアミノ酸エステルの立体選択的加水分解に利用するにあたっては、上記のようにして得られた培養物(培養液、微生物菌体)をそのまま作用させても良いし、培養物からアミダーゼを単離・精製して使用しても良い。

#### 【実施例】

#### 【0048】

以下に本発明の具体的な実施例を示す。しかし、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

#### 【0049】

##### (実施例1) アミダーゼの単離・精製

アースロバクター・エスピー(Arthrobacter sp.) KNK1101J株を、試験管内で滅菌した6mlの培地A(肉エキス10g、イーストエキス5g、ポリペプトン10g、塩化ナトリウム3g、脱イオン水にて1:1にメスアップ、滅菌前pH6.5)に植菌して30℃で24時間、好氣的に振とう培養した。この培養液2mlをフラスコ内で滅菌した200mlの培地Aに植菌して30℃で48時間、好氣的に振とう培養した。培養終了後、遠心分離で菌体を集菌して、1mMのジチオスレイトール(DTT)を含む50mM Tris-塩酸緩衝液(pH8.0)に菌体を懸濁後、超音波により菌体を破碎し、これを遠心分離した。上清に硫安45%飽和で塩析する沈殿を遠心分離で取得した。この画分を1mMのDTTを含む50mM Tris-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解、同バッファーで透析後、DEAE-TOYOPEAL(東ソー社製)にアプライしてカラムクロマトグラフィーを行い、同緩衝液で洗浄後、同緩衝液で0Mから0.5Mの塩化ナトリウムの濃度勾配をかけて溶出し、活性のあるフラクションを集めた。この活性画分に終濃度0.8Mとなるように硫酸アンモニウムを溶解した後、Phenyl-TOYOPEAL(東ソー社製)にアプライしてカラムクロマトグラフィーを行い、1mMのDTTを含む50mM Tris-塩酸緩衝液(pH8.0)で0.8Mから0Mの硫酸アンモニウムの濃度勾配をかけて溶出した。得られた活性画分を、MonoQ HR5/5(アマシャムファルマシアバイオテック社製)にアプライしてカラムクロマトグラフィーを行い、1mMのDTTを含む50mM Tris-塩酸緩衝液(pH8.0)で洗浄後、同緩衝液で0Mから0.5Mの塩化ナトリウムの濃度勾配をかけて溶出した。得られた活性画分を限外濾過膜(分画分子量10,000)を用いて濃縮した後、Superdex 200

HR 10/30 (アマシヤムファルマシアバイオテック社製) にアプライしてFPLCによるゲルろ過を行い、1mMのDTT及び0.15Mの塩化ナトリウムを含む50mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で溶出した。得られた活性画分をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって分析したところ、アミダーゼは単一バンドとして検出され、精製酵素の純粋性が確認できた。

#### 【0050】

##### (実施例2) アミダーゼを用いたアミノ酸アミドの加水分解

実施例1で得られた精製アミダーゼ活性画分0.1mlを、表2に示す化合物を0.5%含む0.2M Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.5) 0.1mlと混合し、30℃にて15時間振とうした。反応終了後、遠心分離にて固形物を除去し、高速液体クロマトグラフィーにて生成したアミノ酸の収率及び光学純度を分析した結果を表2に示す。

#### 高速液体クロマトグラフィー分析条件

##### [アミノ酸の収率分析]

カラム: COSMOSIL 5C18-AR (4.6mmφ×250mm、ナカライテスク社製)、溶離液: 10mM 磷酸カリウム緩衝液 (pH 2) / アセトニトリル=19/1、流速: 0.5ml/分、カラム温度: 40℃、測定波長: 210nm

##### [アミノ酸の光学純度分析]

カラム: SUMICHIRAL OA-5000 (4.6mmφ×150mm、住化分析センター社製)、溶離液: 2mM 硫酸銅 / アセトニトリル=85/15、流速: 0.8ml/分、カラム温度: 40℃、測定波長: 254nm

#### 【0051】

##### 【表2】

基質	生成アミノ酸		
	収率 (mol%)	立体配置	光学純度 (%ee)
DL-フェニルアラニンアミド塩酸塩	47.2	D	98.5
DL-ロイシンアミド塩酸塩	3.1	D	88.9

#### 【0052】

##### (実施例3) 精製アミダーゼを用いたアミノ酸エステルの加水分解

実施例1で得られた精製アミダーゼ活性画分0.1mlを、0.5%濃度のラセミ体フェニルアラニンエチルエステルを含む0.2M 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸-NaOH緩衝液 (pH 6.5) 0.1mlと混合し、30℃にて15時間振とうした。反応終了後、遠心分離にて固形物を除去し、実施例2と同様の方法で生成したアミノ酸を分析したところ、D体フェニルアラニンが収率29.7mol%、光学純度72.8% eeで得られた。

#### 【0053】

##### (実施例4) アミダーゼ遺伝子の単離

まず、実施例1と同様の方法でアースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) KN K1101J株を培養して得た菌体を、CTAB、クロロホルム、フェノールを用いて溶解、処理後、抽出されたDNAをイソプロパノールで析出し、遠心分離で得られた沈殿のDNAをエタノールで洗浄すること染色体DNAを調製した。(Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)を参照。) 次いで、実施例1で精製したアミダーゼのアミノ末端のアミノ酸配列を気相プロテイン・シーケンサーを用いて決定した。さらに、実施例1で精製したアミダーゼにリジルエン

ドペプチダーゼを4Mの尿素の存在下作用させて生成したポリペプチド断片を逆相HPLCを用いて精製した後、上記と同様の方法でアミダーゼの内部アミノ酸配列を決定した。N末端アミノ酸配列にもとづいて設計したDNAプライマー(Primer-1:配列表の配列番号4)と、内部アミノ酸配列にもとづいて設計したDNAプライマー(Primer-2:配列表の配列番号5)を用いて、先に得た染色体DNAを鋳型にPCRを行った。この結果、目的のアミダーゼ遺伝子の一部(部分遺伝子と称す)を取得した。

#### 【0054】

次に、目的遺伝子の全長を取得するために以下の操作を行った。上記部分遺伝子において、酵素のN末端側、C末端側それぞれの部分に相当する塩基配列にもとづき、部分遺伝子の外側方向へ向けたDNAプライマー(Primer-3:配列表の配列番号6、及び、Primer-4:配列表の配列番号7)を合成した。このプライマーを用い、先に得た染色体DNAを制限酵素SacI、PvuI、SalI、XhoIで分解したものをT4 DNAリガーゼを用いて環化させて得たDNAを鋳型に、インバースPCRを行った。これにより、既に取得した部分遺伝子のさらに外側の遺伝子部分を含むDNA断片を取得した。このDNA断片の塩基配列を決定後、酵素のN末端をコードするDNAよりも上流と推定される塩基配列に制限酵素BamHIの切断部位を結合させた配列をもつDNAプライマー(Primer-5:配列表の配列番号8)と、C末端をコードするDNAより下流と推定される塩基配列に制限酵素SacI切断部位を結合させた配列をもつDNAプライマー(Primer-6:配列表の配列番号9)を用いて、この配列の間のDNAをPCRにより増幅することでアミダーゼ遺伝子の全長を含むDNA断片(配列表の配列番号2)を取得した。得られたDNA断片の一部の塩基配列の解析から、アミダーゼ遺伝子の全長(配列表の配列番号3)が含まれていることを確認した。

#### 【0055】

##### (実施例5) アミダーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドの作成と遺伝子の解析

実施例4で得られたアミダーゼ遺伝子全長を含むDNA断片と、制限酵素EcoRVで切断したベクタープラスミドpT7BlueをT4 DNAリガーゼを用いて結合することで、図1の制限酵素地図で表され、アミダーゼ遺伝子を含むプラスミドpHA001を取得した。

#### 【0056】

取得したプラスミドpHA001を用いて、実施例4で得られたDNA断片の塩基配列を解析した。この結果、精製したアミダーゼを用いて決定したN末端アミノ酸配列及び内部アミノ酸配列をコードする塩基があることを確認した。また、翻訳開始部位と終止コードを確認し、オープンリーディングフレームを決定した。このようにして得られた、アミダーゼ遺伝子全長を含むDNA断片の塩基配列を配列表の配列番号2に、オープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号3に、塩基配列より推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示した。

#### 【0057】

##### (実施例6) アミダーゼ遺伝子を大量発現する組換えプラスミドの作成

実施例5で得られたアミダーゼ遺伝子のN末端、C末端部分にそれぞれ制限酵素NdeI及びSacIの切断部位を結合させた配列を持つプライマー(Primer-7:配列表の配列番号10、Primer-8:配列表の配列番号11)を用いて、この間のDNAをPCRにより増幅することで配列表配列番号3に示されるオープンリーディングフレームのDNA断片を取得した。

#### 【0058】

このDNA断片を制限酵素NdeIとSacIで切断し、同酵素で切断したベクタープラスミドpUCNT(WO94/03613参照)とT4 DNAリガーゼを用いて結合することで、図2の制限酵素地図で表され、アミダーゼ遺伝子をpHA001よりも多く発現できるように設計されたpHA002を取得した。

## 【0059】

## (実施例7) アミダーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを用いた形質転換体の作成

実施例6で得られたプラスミドpHA002をエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101のコンピテントセルと混合することで形質転換を行い、寒天培地B (トリプトン10g、イーストエキス5g、塩化ナトリウム10g、寒天15g、アンピシリン100mg、脱イオン水にて1lにメスアップ、滅菌前pH7.0、ただしアンピシリンは滅菌後に添加する) にプレーティングして、アミダーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを含む形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 (pHA002) をコロニーとして取得した。

## 【0060】

得られた形質転換体のコロニーを、試験管内にて滅菌した6mlの培地C (トリプトン10g、イーストエキス5g、塩化ナトリウム10g、アンピシリン100mg、脱イオン水にて1lにメスアップ、滅菌前pH7.0、ただしアンピシリンは滅菌後に添加する) に植菌後、37℃で24時間、振とうして好氣的に培養した。得られた培養液から遠心分離により菌体を集菌し、1mMのジチオスレイトール (DTT) を含む50mM Tris-塩酸緩衝液 (pH8.0) に懸濁して超音波により菌体を破碎した後、遠心分離により菌体由来の不溶物を除去して、形質転換体のアミダーゼ酵素液を取得した。得られた酵素液0.1mlを、50mMのD体フェニルアラニンアミド塩酸塩を含む0.2M Tris-塩酸緩衝液 (pH8.5) 0.1mlと混合し、30℃で15時間反応を行ったところ、D体フェニルアラニンの生成が認められ、形質転換体にアミダーゼ活性があることが確認された。

## 【0061】

なお、得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 (pHA002) は平成16年1月22日に受託番号FERM P-19646として独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。

## 【0062】

## (実施例8) 組換え菌を用いたアミノ酸エステルの加水分解

実施例7で得られたエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 (pHA002) の培養液0.1mlを、1%濃度のラセミ体フェニルアラニンエチルエステルを含む0.2M 2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸-NaOH緩衝液 (pH6.5) 0.1mlと混合し、30℃にて15時間振とうした。反応終了後、遠心分離にて固形物を除去し、実施例2と同様の方法で生成したアミノ酸を分析したところ、D体フェニルアラニンが収率34.7mol%、光学純度53.6% eeで得られた。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0063】

【図1】 本発明のアミダーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドpHA001の図。

【図2】 本発明のアミダーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドpHA002の図。



## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 鐘淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

&lt;120&gt; アミダーゼ活性を有するポリペプチド及びその遺伝子

&lt;130&gt; B040008

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 388

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arthrobacter sp.

&lt;400&gt; 1

Met Ser Arg Leu Leu Arg Glu His Gly Ile Val Ile Gly Arg Leu Gln  
 1 5 10 15

Pro Gly Ser Leu Asn Thr Ile Ala Asp Val Ala Gly Val Arg Val Gly  
 20 25 30

His Ser Thr Ile Met Arg Gly Ser Gly Pro Leu Ser Ile Gly His Gly  
 35 40 45

Pro Val Arg Thr Gly Val Thr Ala Ile Ile Pro His Glu Gly Asp Ile  
 50 55 60

Trp Glu Glu Pro Arg Phe Ala Gly Val Phe Ser Leu Asn Gly Ser Gly  
 65 70 75 80

Glu Trp Ser Gly Thr Ser Phe Val Arg Glu Thr Gly Cys Leu Tyr Gly  
 85 90 95

Pro Ile Met Thr Thr Asn Ser His Ser Ile Gly Ser Val Arg Asn Ala  
 100 105 110

Val Ile Lys Arg Glu Val Ala Arg Arg Gly Ser Leu Glu Arg Leu Pro  
 115 120 125

Leu Val Gly Glu Thr Phe Asp Gly Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Met  
 130 135 140

His Val Lys Asp Glu His Val Ala Glu Ala Ile Asp Ser Ala Ser Ala  
 145 150 155 160

Asn Val Thr Glu Gly Asn Val Gly Gly Gly Thr Gly Asn Val Cys His  
 165 170 175

Gly Phe Lys Gly Gly Ile Gly Ser Ala Ser Arg Val Leu Gln Leu Gly  
180 185 190

Glu Glu Thr Tyr Thr Leu Gly Val Leu Val Gln Ala Asn His Gly Leu  
195 200 205

Arg Asp Glu Phe Gln Val Thr Gly Val Pro Val Gly Arg Leu Ile Ser  
210 215 220

Thr Asp Glu Ile Pro Leu Gly Pro Ser Gly Phe Asp Arg Arg Ser Ser  
225 230 235 240

Pro His Lys Asn Ser Ile Leu Val Val Val Ala Thr Asp Ala Pro Leu  
245 250 255

Leu Pro Gly Gln Leu Glu Arg Val Ala His Arg Ser Thr Leu Gly Ile  
260 265 270

Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Ala His Asn Leu Ser Gly Asp Leu Ala Leu  
275 280 285

Ala Phe Ser Thr Cys Pro Gln Pro Val Ser Gly Tyr Asp Phe Gly Val  
290 295 300

Asp Thr Ser Pro Gly Thr Ile Arg Ala Leu Pro Asn Ala Ala Thr Ala  
305 310 315 320

Gly Leu Phe Glu Ala Ala Val Glu Ala Thr Glu Glu Ala Ile Val Ser  
325 330 335

Ala Leu Val His Ala Asp Thr Cys Thr Gly Ile Asp Asp Arg Val Ala  
340 345 350

Tyr Gly Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ala Arg Ser Ile Ser Glu Tyr Arg  
355 360 365

Gly Thr Gln Leu Tyr Pro Glu Lys Val Ser Asp Ser His Leu Glu Arg  
370 375 380

Arg Ser Gln Pro  
385

<210> 2

<211> 1290

<212> DNA

<213> Arthrobacter sp.

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (53)..(1219)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 2

agcgcgtcgt ggactgggtg cagaaataca caggcgagcc cgaggacgaa aa atg agc 58  
 Met Ser  
 1

cgt ctg ctc cgt gag cac gga atc gtc atc ggt cgt ctc caa ccg ggt 106  
 Arg Leu Leu Arg Glu His Gly Ile Val Ile Gly Arg Leu Gln Pro Gly  
 5 10 15

tct ctg aac acc att gca gac gtc gca ggc gtt cgc gta ggc cat tca 154  
 Ser Leu Asn Thr Ile Ala Asp Val Ala Gly Val Arg Val Gly His Ser  
 20 25 30

aca atc atg cgc ggt tct ggg ccc ctg tcc atc ggc cat ggc cca gtt 202  
 Thr Ile Met Arg Gly Ser Gly Pro Leu Ser Ile Gly His Gly Pro Val  
 35 40 45 50

cgc aca ggg gta aca gcc atc atc cct cac gaa gga gac atc tgg gag 250  
 Arg Thr Gly Val Thr Ala Ile Ile Pro His Glu Gly Asp Ile Trp Glu  
 55 60 65

gag cca cgg ttc gcc ggc gtc ttc tcc ctg aat ggc agc ggt gaa tgg 298  
 Glu Pro Arg Phe Ala Gly Val Phe Ser Leu Asn Gly Ser Gly Glu Trp  
 70 75 80

agc gga acc tcg ttc gtc agg gag acc ggg tgt ctt tat ggc cct atc 346  
 Ser Gly Thr Ser Phe Val Arg Glu Thr Gly Cys Leu Tyr Gly Pro Ile  
 85 90 95

atg acg acg aat tcg cac agc att gga tcg gtc agg aac gcc gtc atc 394  
 Met Thr Thr Asn Ser His Ser Ile Gly Ser Val Arg Asn Ala Val Ile  
 100 105 110

aag cgt gaa gta gcc cgg cgg gga agc ctg gag agg ctc cct ctc gtg 442  
 Lys Arg Glu Val Ala Arg Arg Gly Ser Leu Glu Arg Leu Pro Leu Val  
 115 120 125 130

gga gaa acc ttt gat ggc cta ctc aat gac atc agc ggc atg cac gtc 490  
 Gly Glu Thr Phe Asp Gly Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Met His Val  
 135 140 145

aag gac gaa cac gtg gcc gag gcc atc gac tcc gcc tcc gca aat gtt 538  
 Lys Asp Glu His Val Ala Glu Ala Ile Asp Ser Ala Ser Ala Asn Val  
 150 155 160

acc gaa ggc aat gtt ggc ggt ggg acc gga aat gtt tgt cac ggt ttc 586

Thr	Glu	Gly	Asn	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Val	Cys	His	Gly	Phe	
		165					170					175				
aaa	ggc	ggt	att	gga	agt	gcc	tcg	cgc	gtg	ttg	caa	ttg	ggc	gag	gaa	634
Lys	Gly	Gly	Ile	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Val	Leu	Gln	Leu	Gly	Glu	Glu	
	180					185				190						
acc	tac	act	ttg	ggg	gtt	ctc	gtc	caa	gcc	aac	cac	ggc	ctt	cgt	gac	682
Thr	Tyr	Thr	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Gln	Ala	Asn	His	Gly	Leu	Arg	Asp	
195					200					205					210	
gaa	ttt	cag	gtg	acg	gga	gta	ccc	gtg	gga	agg	ctc	ata	tct	acg	gac	730
Glu	Phe	Gln	Val	Thr	Gly	Val	Pro	Val	Gly	Arg	Leu	Ile	Ser	Thr	Asp	
			215						220					225		
gag	atc	ccc	ttg	ggg	cct	tca	ggt	ttt	gat	cga	agg	tct	tca	cca	cac	778
Glu	Ile	Pro	Leu	Gly	Pro	Ser	Gly	Phe	Asp	Arg	Arg	Ser	Ser	Pro	His	
			230					235						240		
aaa	aac	agt	att	ctt	gtc	gtc	gtg	gca	acc	gac	gcg	cct	cta	cta	ccg	826
Lys	Asn	Ser	Ile	Leu	Val	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	
		245					250					255				
ggc	caa	ctg	gaa	cgc	gtt	gct	cac	cgt	tct	acc	cta	ggc	att	gcc	cgt	874
Gly	Gln	Leu	Glu	Arg	Val	Ala	His	Arg	Ser	Thr	Leu	Gly	Ile	Ala	Arg	
	260					265					270					
aat	ggt	gcc	tac	gcg	cac	aat	ctc	agc	ggc	gac	ctt	gca	ctt	gcg	ttc	922
Asn	Gly	Ala	Tyr	Ala	His	Asn	Leu	Ser	Gly	Asp	Leu	Ala	Leu	Ala	Phe	
275					280					285					290	
tcc	acc	tgc	ccg	cag	cct	gta	agc	ggt	tac	gat	ttc	gga	gtg	gat	aca	970
Ser	Thr	Cys	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Gly	Val	Asp	Thr	
				295					300					305		
agt	cct	ggg	acc	att	cgc	gcc	ctg	ccc	aac	gcc	gca	acg	gct	ggc	ctc	1018
Ser	Pro	Gly	Thr	Ile	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	
			310					315					320			
ttc	gag	gcg	gcc	gtt	gag	gcc	act	gag	gaa	gcg	att	gtt	tcc	gcg	ctt	1066
Phe	Glu	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Thr	Glu	Glu	Ala	Ile	Val	Ser	Ala	Leu	
		325					330					335				
gtc	cac	gcc	gac	acc	tgc	acc	ggg	atc	gat	gac	agg	gtt	gcc	tat	ggg	1114
Val	His	Ala	Asp	Thr	Cys	Thr	Gly	Ile	Asp	Asp	Arg	Val	Ala	Tyr	Gly	
	340					345					350					
ttg	gag	gcg	gct	cga	ctt	gct	cgt	tca	att	tcg	gaa	tat	cga	ggc	acc	1162
Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala	Arg	Ser	Ile	Ser	Glu	Tyr	Arg	Gly	Thr	
355					360					365				370		

cag ctg tat ccg gag aaa gtg tcg gat tcc cat ctt gaa cga agg agc 1210  
 Gln Leu Tyr Pro Glu Lys Val Ser Asp Ser His Leu Glu Arg Arg Ser  
 375 380 385

cag ccg tga ccgccgcgca gccaaagccaa gcaccacccc gggcaaaggc 1259  
 Gln Pro

cgggaaacgg tccaacctaa cacgcaacga t 1290

<210> 3  
 <211> 1167  
 <212> DNA  
 <213> Arthrobacter sp.

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1167)  
 <223>

<400> 3  
 atg agc cgt ctg ctc cgt gag cac gga atc gtc atc ggt cgt ctc caa 48  
 Met Ser Arg Leu Leu Arg Glu His Gly Ile Val Ile Gly Arg Leu Gln  
 1 5 10 15

ccg ggt tct ctg aac acc att gca gac gtc gca ggc gtt cgc gta ggc 96  
 Pro Gly Ser Leu Asn Thr Ile Ala Asp Val Ala Gly Val Arg Val Gly  
 20 25 30

cat tca aca atc atg cgc ggt tct ggg ccc ctg tcc atc ggc cat ggc 144  
 His Ser Thr Ile Met Arg Gly Ser Gly Pro Leu Ser Ile Gly His Gly  
 35 40 45

cca gtt cgc aca ggg gta aca gcc atc atc cct cac gaa gga gac atc 192  
 Pro Val Arg Thr Gly Val Thr Ala Ile Ile Pro His Glu Gly Asp Ile  
 50 55 60

tgg gag gag cca cgg ttc gcc ggc gtc ttc tcc ctg aat ggc agc ggt 240  
 Trp Glu Glu Pro Arg Phe Ala Gly Val Phe Ser Leu Asn Gly Ser Gly  
 65 70 75 80

gaa tgg agc gga acc tcg ttc gtc agg gag acc ggg tgt ctt tat ggc 288  
 Glu Trp Ser Gly Thr Ser Phe Val Arg Glu Thr Gly Cys Leu Tyr Gly  
 85 90 95

cct atc atg acg acg aat tcg cac agc att gga tcg gtc agg aac gcc 336  
 Pro Ile Met Thr Thr Asn Ser His Ser Ile Gly Ser Val Arg Asn Ala

100	105	110	
gtc atc aag cgt gaa gta gcc cgg cgg gga agc ctg gag agg ctc cct			384
Val Ile Lys Arg Glu Val Ala Arg Arg Gly Ser Leu Glu Arg Leu Pro			
115	120	125	
ctc gtg gga gaa acc ttt gat ggc cta ctc aat gac atc agc ggc atg			432
Leu Val Gly Glu Thr Phe Asp Gly Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Met			
130	135	140	
cac gtc aag gac gaa cac gtg gcc gag gcc atc gac tcc gcc tcc gca			480
His Val Lys Asp Glu His Val Ala Glu Ala Ile Asp Ser Ala Ser Ala			
145	150	155	160
aat gtt acc gaa ggc aat gtt ggc ggt ggg acc gga aat gtt tgt cac			528
Asn Val Thr Glu Gly Asn Val Gly Gly Gly Thr Gly Asn Val Cys His			
165	170	175	
ggt ttc aaa ggc ggt att gga agt gcc tcg cgc gtg ttg caa ttg ggc			576
Gly Phe Lys Gly Gly Ile Gly Ser Ala Ser Arg Val Leu Gln Leu Gly			
180	185	190	
gag gaa acc tac act ttg ggg gtt ctc gtc caa gcc aac cac ggc ctt			624
Glu Glu Thr Tyr Thr Leu Gly Val Leu Val Gln Ala Asn His Gly Leu			
195	200	205	
cgt gac gaa ttt cag gtg acg gga gta ccc gtg gga agg ctc ata tct			672
Arg Asp Glu Phe Gln Val Thr Gly Val Pro Val Gly Arg Leu Ile Ser			
210	215	220	
acg gac gag atc ccc ttg ggg cct tca ggt ttt gat cga agg tct tca			720
Thr Asp Glu Ile Pro Leu Gly Pro Ser Gly Phe Asp Arg Arg Ser Ser			
225	230	235	240
cca cac aaa aac agt att ctt gtc gtc gtg gca acc gac gcg cct cta			768
Pro His Lys Asn Ser Ile Leu Val Val Val Ala Thr Asp Ala Pro Leu			
245	250	255	
cta ccg ggc caa ctg gaa cgc gtt gct cac cgt tct acc cta ggc att			816
Leu Pro Gly Gln Leu Glu Arg Val Ala His Arg Ser Thr Leu Gly Ile			
260	265	270	
gcc cgt aat ggt gcc tac gcg cac aat ctc agc ggc gac ctt gca ctt			864
Ala Arg Asn Gly Ala Tyr Ala His Asn Leu Ser Gly Asp Leu Ala Leu			
275	280	285	
gcg ttc tcc acc tgc ccg cag cct gta agc ggt tac gat ttc gga gtg			912
Ala Phe Ser Thr Cys Pro Gln Pro Val Ser Gly Tyr Asp Phe Gly Val			
290	295	300	

gat aca agt cct ggg acc att cgc gcc ctg ccc aac gcc gca acg gct 960  
 Asp Thr Ser Pro Gly Thr Ile Arg Ala Leu Pro Asn Ala Ala Thr Ala  
 305 310 315 320

ggc ctc ttc gag gcg gcc gtt gag gcc act gag gaa gcg att gtt tcc 1008  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ala Val Glu Ala Thr Glu Glu Ala Ile Val Ser  
 325 330 335

gcg ctt gtc cac gcc gac acc tgc acc ggg atc gat gac agg gtt gcc 1056  
 Ala Leu Val His Ala Asp Thr Cys Thr Gly Ile Asp Asp Arg Val Ala  
 340 345 350

tat ggg ttg gag gcg gct cga ctt gct cgt tca att tcg gaa tat cga 1104  
 Tyr Gly Leu Glu Ala Ala Arg Leu Ala Arg Ser Ile Ser Glu Tyr Arg  
 355 360 365

ggc acc cag ctg tat ccg gag aaa gtg tcg gat tcc cat ctt gaa cga 1152  
 Gly Thr Gln Leu Tyr Pro Glu Lys Val Ser Asp Ser His Leu Glu Arg  
 370 375 380

agg agc cag ccg tga 1167  
 Arg Ser Gln Pro  
 385

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer-1

<400> 4

gngarcaygg nathgt

16

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer-2

<400> 5

gtrtangtyt cytcncc

17

<210> 6

<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer-3

<400> 6  
tgccattcag ggagaagac

19

<210> 7  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer-4

<400> 7  
cacgtcaagg acgaacac

18

<210> 8  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer-5

<400> 8  
taattaggat ccagcgcgtc gtggactg

28

<210> 9  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer-6

<400> 9  
ataaccggag ctcacgttg cgtgtaggt t

31

<210> 10  
<211> 28  
<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer-7

<400> 10

tcctgctcat atgagccgtc tgctccgt

28

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

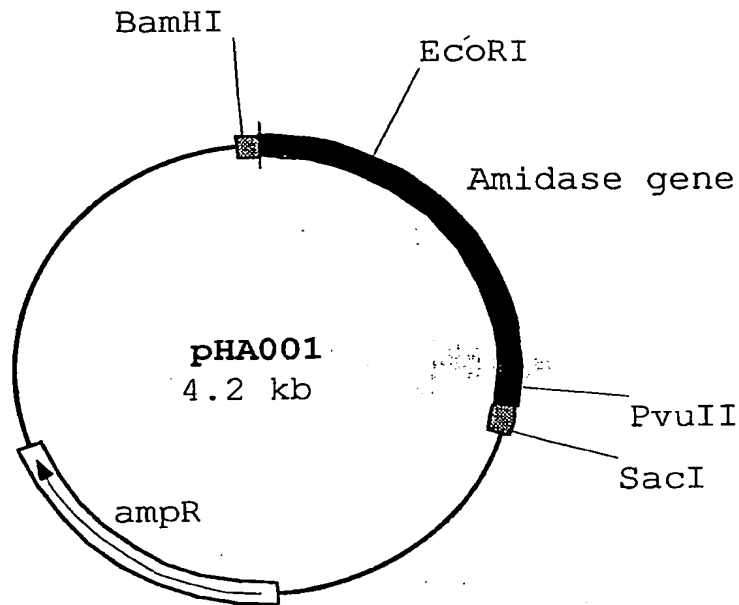
<223> Description of Artificial Sequence: primer-8

<400> 11

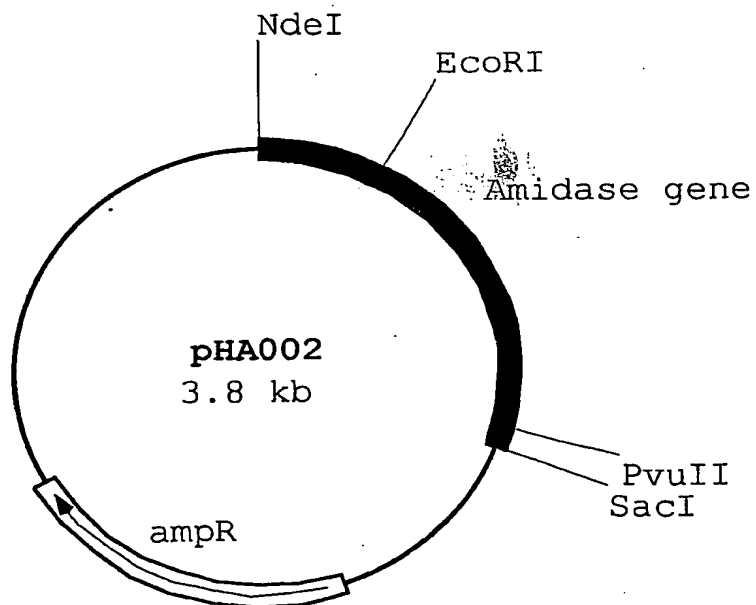
attctatgag ctcacggctg gctccttcg

29

【書類名】図面  
【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 光学活性アミノ酸、特にD-アミノ酸の製造に有用な新規なアミダーゼ、ならびにその製造方法を提供する。

【解決手段】 アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) KNK1101J株から単離・精製された新規D-アミダーゼ。当該アミダーゼをコードする遺伝子、当該遺伝子を含む組換えプラスミド、及び当該アミダーゼ遺伝子を導入された形質転換体。及び、アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) KNK1101J株あるいは上記形質転換体を培養し当該アミダーゼを採取する、アミダーゼの製造方法。

【選択図】 なし。

特願 2004-028041

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月 27日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
氏 名 鐘淵化学工業株式会社
2. 変更年月日 2004年 9月 1日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
氏 名 株式会社カネカ

From the INTERNATIONAL BUREAU

## PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

KANEKA CORPORATION  
2-4, Nakanoshima 3-chome  
Kita-ku, Osaka-shi  
Osaka 5308288  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 05 April 2005 (05.04.2005)	
Applicant's or agent's file reference B040008WO01-	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP05/000951	International filing date (day/month/year) 26 January 2005 (26.01.2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 04 February 2004 (04.02.2004)
Applicant KANEKA CORPORATION et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
04 February 2004 (04.02.2004)	2004-028041	JP	24 March 2005 (24.03.2005)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Landicho Remedios

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 70 10  
Telephone No. +41 22 338 8468